

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

	บริษัทที่ผลิต
เครื่อง shaker	Memmert
เครื่อง water bath	Memmert
เครื่อง centrifuge (Sorvall RC 26 Plus)	Dupont
เครื่อง spectonic 21	Milton Roy
เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)	Cenco
UV-VIS Spectrophotometer	Phillips
Hot plate and stirrer	Cole-Parmer
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	Hirayama

2.2 สารเคมี

Acetylacetone	BDH
Ammonium sulfate	Fluka
Bovine serum albumin	Fluka
Coomassie brilliant blue G-250	Fluka
Citric acid	Carlo ERBA
Calcium chloride	Carlo ERBA
Carboxy methyl cellulose	Fluka
Casein	BDH
Dinitrosalicylic acid	Sigma
Ethanol	Merck
Glucose	Sigma
Glucosamine	Sigma
Hydrochloric acid	Merck
L-glutamine	Fluca
Mercuric iodide	M&B

p-dimethylamino benzaldehyde	Fluka
Potassium dihydrogen phosphate	Carlo ERBA
Potassium hydrogen phosphate	Fluka
Potassium iodide	Carlo ERBA
Phosphoric acid	J.T.Baker
Potassium hydroxide	Carlo ERBA
Potato dextrose agar	Sigma
Potato starch	Fluka
Sodium carbonate	Fluka
Sodium chloride	Sigma
Sodium dihydrogen phosphate	Fluka
Sodium hydrogen phosphate	Sigma
Sodium hydroxide	EKA
Sodium potassium tartrate	Fluka
Sulfuric acid	LAB-SCAN
Trichloroacetic acid	Carlo ERBA
Tri-sodium citrate	Merck
Trihydroxy aminomethylamine	Sigma
Tyrosine	Fluka

2.3 จุลินทรีย์

เชื้อ *Aspergillus* spp.1

เชื้อ *Aspergillus* spp.2

เชื้อ *Aspergillus* spp.3

เชื้อ *Aspergillus* spp.4

จากหน่วยบริการเชื้อพันธุจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง

ประเทศไทย

2.4 วัตถุประสงค์

กากมัสตาร์ด (mustard meal)

2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 การผลิตและสกัดเอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus*

2.5.1.1 การผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus* (26, 86)

1. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อตั้งต้น (inoculum) ของเชื้อ *Aspergillus*

เชื้อเชื้อ *Aspergillus* ลงบนวุ้นเอียง (slant) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร และเขย่าให้สปอร์ที่วุ้นเอียงหลุดออกมาแขวนลอยในน้ำกลั่น เจือจางให้เหมาะสมแล้วนำไปนับด้วยสไลด์นับเซลล์ (hemocytometer)

2. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus*

ก. การหาเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ในกากมัสตาร์ด

ชั่งกากมัสตาร์ด 10.0 กรัม แล้วใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 20 ใบ ทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อ *Aspergillus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ให้มีปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อ 10 กรัมของอาหารแห้ง โดยถ่ายเชื้อสายพันธุ์ละ 5 ใบ ปรับความชื้นโดยใช้ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อในปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส ทำการสกัดเอนไซม์ในแต่ละเชื้อทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ข. การหาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus*

ชั่งกากมัสตาร์ด 10.0 กรัม แล้วใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 30 ใบ ทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ต้องการศึกษาให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 และ 5×10^7 สปอร์ต่อ 10 กรัมของอาหารแห้ง ในปริมาณเชื้อตั้งต้นละ 5 ใบ ปรับความชื้นโดยใช้ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อในปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส ทำการสกัดเอนไซม์ในแต่ละปริมาณเชื้อตั้งต้นทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ค. การหาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus*

ซึ่งกากมัสตาร์ด 10.0 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 25 ใบ ทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนิ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ต้องการศึกษาให้มีปริมาณเชื้อ เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อ 10 กรัมของอาหารแข็ง ปรับความชื้นโดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อในปริมาตร 4.0, 7.0, 10.0, 16.0 และ 23.0 มิลลิลิตร ความชื้นเริ่มต้นละ 5 ใบ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส ทำการสกัดเอนไซม์ในแต่ละความชื้นเริ่มต้นทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ง. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus*

ซึ่งกากมัสตาร์ด 10.0 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ ทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนิ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ต้องการศึกษาให้มีปริมาณเชื้อ เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อ 10 กรัมของอาหารแข็ง ปรับความชื้นโดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อในปริมาตร 16.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10, 20, 25, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ทำการสกัดเอนไซม์ในแต่ละอุณหภูมิทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

2.5.1.2 การสกัดเอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus* (8, 27, 90)

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 60 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ที่ภายในมีกากมัสตาร์ด ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* นำไปเขย่าในเครื่องเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนบนกรองผ่านกระดาษกรอง (whatman เบอร์ 1) ส่วนตะกอนนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนิ่งความดันไอน้ำ (autoclave) และนำไปหาปริมาณ glucosamine ต่อไป ส่วนสารละลายเอนไซม์ที่ได้นำไปตกตะกอนด้วยเอธานอล (ice cool absolute ethanol) ในปริมาตร 3 เท่า แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งและนำส่วนตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ต่อไป

2.5.2 การศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส (19, 45, 54, 68, 69, 93)

2.5.2.1 การเตรียมสารสำหรับศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส

ก. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 นอร์มอล

ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ข. สารละลาย 3,5-ไดไนโตรซาลิซิลิก (DNS)

ซึ่งกรดไดไนโตรซาลิซิลิก 1.0 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 นอร์มอล ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปอีก 50.0 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียม ทาร์เทรต 30 กรัม คนต่อจนละลายหมด แล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ค. สารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์

ซึ่งกลูโคส 0.1802 กรัม นำไปละลายและปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0

สารละลาย A

ซึ่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.7801 กรัม ละลายน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

สารละลาย B

สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แอนไฮดรัส 0.7098 กรัม ละลายน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารละลาย A ปริมาตร 78.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B ปริมาตร 122.0 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วยสารละลาย B

จ. การเตรียมสับสเตรทแป้ง

ซึ่งแป้งมันสำปะหลัง 1.0 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 15.0 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ รินบัฟเฟอร์ที่ต้มเดือดลงไปอีก 70.0 มิลลิลิตร พร้อมกับคนสารละลายตลอดเวลา จากนั้นนำไปต้มจนเดือดอีก 15 นาที แล้วทำให้สารละลายเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรสารละลายแป้งด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2.5.2.2 การทำกราฟมาตรฐานกลูโคส

ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรตั้งแต่ 0.1-1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง 10 หลอด จากนั้นปรับปริมาตรในแต่ละหลอดด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS reagent หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร เขย่าแล้วแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นลงไปอีกหลอดละ 10.0 มิลลิลิตร เพื่อเจือจาง เขย่าแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตาราง 2.1

ตาราง 2.1 แสดงการทำกราฟมาตรฐานกลูโคส

สารที่ใช้ (มิลลิลิตร)	หลอดที่					
	Blank	1	2	3	4	5
สารละลาย กลูโคส 10 mM.	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
น้ำกลั่น	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	-
สารละลาย DNS	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
เขย่าให้เข้ากันแล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 10.0 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร						

2.5.2.3 การหาแอกติวิตีของเอนไซม์อะไมเลสโดย DNS reagent

เจือจางสารละลายเอนไซม์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์ที่มี 0.5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ pH 7.4 ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายเอนไซม์เจือจาง 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมสารละลายสับสเตรทแป้งที่สุกแล้วลงไป 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม DNS reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นอีก 10.0 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดย blank คือสารละลายบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป

กำหนด หนึ่งหน่วยอะไมเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7.4

2.5.3 การศึกษาแอสติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (8, 20, 27, 70)

2.5.3.1 การเตรียมสารสำหรับศึกษาแอสติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส

ก. สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์

ซึ่งกลูโคส 0.030 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย

น้ำกลั่น

ข. สารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 นอร์มอล

ซึ่งไซเตียมไฮดรอกไซด์ 8.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรในขวดวัด

ปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ค. สารละลาย 3,5-ไดไนโตรซาลิซิลิก (DNS)

ซึ่งกรดไดไนโตรซาลิซิลิก 1.0 กรัม ละลายในสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น

2.0 นอร์มอล ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปอีก 50.0 คนให้ละลายจากนั้นเติม

ไซเตียมโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต 30.0 กรัม คนต่อจนละลายหมด ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตร

ขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ง. สารละลายบัฟเฟอร์ซิเตรตเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8

ซึ่งซิเตริก แอซิดโมโนไฮเดรต (Citric acid monohydrate) 2.1 กรัม เติมน้ำกลั่น

และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย Citric acid เข้มข้น 0.1 โมลาร์

ซึ่งไตรไซเตียมซิเตรต (Trisodium citrate) 7.43 กรัม เติมน้ำกลั่น และปรับ

ปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย Tri-sodium citrate เข้มข้น 0.1 โมลาร์

นำสารละลาย Citric acid เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับสาร

ละลาย Tri-sodium citrate เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด

500 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดปริมาตร จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 4.8

จ. การเตรียม 1 % (w/v) Carboxymethyl cellulose (CMC) ในสารละลายบัฟเฟอร์

ไซเตรตเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8

ซึ่ง CMC 1.0 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ไซเตรต เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 คนให้

เข้ากัน และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2.5.3.2 การทำกราฟมาตรฐานกลูโคส

ปิเปตสารละลายกลูโคส 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 – 1.4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลางจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในน้ำเย็นแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานสามารถสรุปการเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคสได้ดังตาราง 2.2

ตาราง 2.2 แสดงการเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

สารที่ใช้ (มิลลิลิตร)	หลอดที่							
	Blank	1	2	3	4	5	6	7
สารละลาย กลูโคส 2 mM.	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
น้ำกลั่น	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
สารละลาย DNS	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

เขย่าให้เข้ากันแล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.5.3.3 วิธีหาแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสโดย DNS reagent

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นเหมาะสมแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 1 % CMC ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 ลงไป 0.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไป Incubate ในน้ำอุ่นที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นอีก 1.0 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดย Blank คือ ซีเตรตบัฟเฟอร์ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นอ่านได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน หลังจากหักค่า OD_{540} ซึ่งอ่านได้จากหลอดที่เป็นหลอดเปรียบเทียบออกแล้ว

กำหนด หนึ่งหน่วยเซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 4.8

2.5.4 การศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (9, 33, 50, 96)

2.5.4.1 การเตรียมสารสำหรับการหาแอกติวิตีของโปรติเอสด้วยวิธีไฮโดรไลซ์เคซีน

ก. สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ pH 7.0
ซึ่งไตรไฮดรอกซี อะมิโนเมทิลามีน (Tris) 1.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6.0 โมลาร์ เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.37 กรัม ปรับปริมาณในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร

ข. สารละลายเคซีน เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v)
ซึ่งเคซีน 1.0 กรัม ละลายในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ของแคลเซียมคลอไรด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

ค. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v)
ซึ่ง Trichloroacetic acid 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

ง. สารละลายไทโรซีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ซึ่งไทโรซีน 10.00 มิลลิกรัม ละลายน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2.5.4.2 การทำกราฟมาตรฐานไทโรซีน

เจือจางสารละลายไทโรซีนให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารละลายไทโรซีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่ 1.0-9.0 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 10.0 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไทโรซีน โดยสามารถสรุปได้ในตาราง 2.3

ตาราง 2.3 แสดงการเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน

สารที่ใช้ (มิลลิลิตร)	หลอดที่									
	Blank	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ไทโรซีน (100 µg/ml)	-	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
น้ำกลั่น	10	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0

2.5.4.3 การหาแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

ปิเปตสารละลายเคซีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์เจือจางที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันทีแล้วเติม 10 % TCA 2.0 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ส่วนใน blank จะเติมสารละลาย 10 % TCA หลังจากเติม 1 % เคซีนแล้วตั้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที(เท่ากับเวลาที่ใช้ incubate) ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ 4000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เอาส่วนสารละลายใสเหนือตะกอนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยใช้กราฟมาตรฐานไทโรซีน

กำหนด หนึ่งหน่วยโปรติเอส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตกตะกอนในสภาวะการทดลอง และให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรเท่ากับ 1 ไมโครกรัมของไทโรซีนต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 7.0

2.5.5 การศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์กลูตามิเนส (41, 57, 64, 88, 94)

2.5.5.1 การเตรียมสารสำหรับศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์กลูตามิเนส

การเตรียมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 7.2
ซึ่งไตรไฮดรอกซี อะมิโนเมทิลามีน (Tris) 1.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6.0 โมลาร์ ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร

ข. การเตรียมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เข้มข้น 1.5 โมลาร์
ซึ่ง Trichloroacetic acid 24.51 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร

ค. การเตรียมสารละลาย Nessler's reagent

สารละลาย A

ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 143 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร

สารละลาย B

ซึ่ง red mercuric iodide 50 กรัม และโปแตสเซียมไอโอไดด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

เทสารละลาย B ลงในสารละลาย A แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร แล้วเก็บไว้ในขวดใส่สารต่อไป

ง. การเตรียมสารละลาย L-glutamine เข้มข้น 0.04 โมลาร์

ซึ่ง L-glutamine 0.5846 กรัม ละลายในทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 7.2 และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

จ. การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ซึ่งแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1321 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

2.5.5.2 การทำกราฟมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟต

ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง ในปริมาตร 0.01-0.05 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 3.8 มิลลิลิตร ใส่สารละลาย Nessler's reagent 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยสามารถสรุปได้ดังตาราง 2.4

ตาราง 2.4 แสดงการทำกราฟมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟต

สารที่ใช้ (มิลลิลิตร)	หลอดที่					
	Blank	1	2	3	4	5
เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (10 มิลลิโมลาร์)	-	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
น้ำกลั่น	3.80	3.79	3.78	3.77	3.76	3.75
Nessler's reagent	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

2.5.5.3 การหาแอกติวิตีของเอนไซม์กลูตามิเนส

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางให้เหมาะสมแล้วในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 7.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย L-glutamine เข้มข้น 0.04 โมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เข้มข้น 1.5 โมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการหาแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตามิเนส

ปิเปตสารละลายที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตามิเนส 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง เติมน้ำกลั่น 3.7 มิลลิลิตร และสารละลาย Nessler's reagent 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปมที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตามิเนสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟต

กำหนด หนึ่งหน่วยกลูตามิเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดแอมโมเนีย 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7.2

2.5.6 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีการจับด้วยสี (Dye binding assay)

2.5.6.1 ขั้นตอนการเตรียมสาร

ก. การเตรียมสารละลายโปรตีน bovine serum albumin มาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่ง bovine serum albumin 0.0100 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

ข. การเตรียมสี (Dye reagent) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่ง Coomassie brilliant blue G-250 0.0100 กรัม ละลายด้วย 99.8 เปอร์เซ็นต์เอทานอลปริมาตร 4.7 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดฟอสฟอริก 8.5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายสีที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรอง (whatman เบอร์ 1) และเก็บสารละลายสีที่ได้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยสารละลายสีที่เตรียมแต่ละครั้งจะใช้ได้ประมาณ 1 สัปดาห์

ค. การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์

ซึ่งโซเดียมคลอไรด์ 0.8775 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.5.6.2 ขั้นตอนการทำกราฟมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายโปรตีน bovine serum albumin มาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 0.01-0.05 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดกลาง เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 0.60 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายสี (dye reagent) หลอดละ 4.30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดย blank จะใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีน bovine serum albumin ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตาราง 2.5

ตาราง 2.5 แสดงการเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน bovine serum albumin

สาร (มิลลิลิตร)	หลอดที่						
	1	2	3	4	5	6	7
bovine serum albumin	-	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	-
สารตัวอย่าง	-	-	-	-	-	-	0.50
น้ำกลั่น	0.60	0.59	0.58	0.57	0.56	0.55	0.10
สารละลายไซเตียมคลอไรด์	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
สารละลายสี (dye reagent)	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30

2.5.6.3 ขั้นตอนการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีการจับด้วยสี (Dye binding assay)

เจือจางสารละลายที่จะนำมาหาปริมาณโปรตีนให้เหมาะสม แล้วปิเปิดใส่ในหลอดทดลองขนาดกลางในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร สารละลายไซเตียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายสี (Dye reagent) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 4.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดย blank จะใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีน แล้วหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

2.5.7 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus* โดยการหาปริมาณกลูโคซามิน (22, 58, 67, 71)

2.5.7.1 การไฮโดรไลซ์ไคตินให้เป็นกลูโคซามิน

1. ขั้นตอนการเตรียมสาร

ก. การเตรียมสารละลายอิมิตัวโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์

ชั่งโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 120 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนจนโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ละลายได้มากที่สุด แล้วนำเอาสารละลายส่วนใสมาให้

2. ขั้นตอนการไฮโดรไลซ์ไคตินในผนังเซลล์เชื้อ *Aspergillus* เป็นกลูโคซามิน

ชั่งกากมัสตาร์ดที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใน specimen tube เติมสารละลายอิมิตัวโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 10.0 มิลลิลิตร นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วละลายในเอธานอลความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.5.7.2 การทำกราฟมาตรฐานกลูโคซามิน

1. ขั้นตอนการเตรียมสาร

ก. การเตรียมสารละลายกลูโคซามิน เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ชั่งกลูโคซามิน 0.2156 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร

2. ขั้นตอนการทำกราฟมาตรฐานกลูโคซามิน

ปิเปตสารละลายกลูโคซามินเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1-1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็กที่มีจุกปิด เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Acetylacetone reagent 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกหลอดทดลองแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที หลังจากตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม เอธานอล 6 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย Ehrlich's reagent 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดย blank จะใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายกลูโคซามิน

2.5.7.3 การหาปริมาณกลูโคซามีน

1. ขั้นตอนการเตรียมสาร

ก. การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกกับเอธานอล (อัตราส่วน 1:1)

ผสมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 500 มิลลิลิตรและเอธานอล 500 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน แล้วเก็บไว้ในขวดใสสาร

ข. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 4.60 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ค. การเตรียมสารละลาย Ehrlich's reagent

ชั่ง p-dimethylamino benzaldehyde 2.67 กรัม ละลายในสารละลายผสมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นกับเอธานอล (อัตราส่วน 1:1) และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ง. การเตรียมสารละลาย Acetylacetone reagent

ผสม Acetylacetone 1 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5 นอร์มอล 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวดใสสาร

2. ขั้นตอนการหาปริมาณกลูโคซามีน

ปิเปตสารละลายกลูโคซามีนที่ได้จากการย่อยกากมันฝรั่ง 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดกลางที่มีจุกปิด เติมสารละลาย Acetylacetone reagent 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกหลอดทดลองแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที หลังจากตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมเอธานอล 6 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย Ehrlich's reagent 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณกลูโคซามีนที่ได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายกลูโคซามีนมาตรฐาน